





© BSN 2006

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi .....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Komposisi .....	1
4 Syarat mutu .....	2
5 Pengambilan contoh .....	2
6 Cara uji .....	3
7 Syarat lulus uji .....	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Metode pengambilan contoh susu bubuk .....	4
Lampiran B (normatif) Cara uji parameter syarat mutu susu bubuk .....	8
Bibliografi .....	38
Tabel 1 Syarat mutu susu bubuk .....	2
Tabel A.1 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb) .....	5
Tabel A.2 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb).....	6
tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb) .....	6
Tabel A.3 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb).....	6
Tabel A.4 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb) .....	6
Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5kg (10 lb).....	7
Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb).....	7
Tabel B.1 Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC .....	27
Tabel B.2 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung .....	28
untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh .....	28
Tabel B.4 Reaksi biokimia dan serologi <i>salmonella</i> .....	36
Tabel B.5 Reaksi biokima dan serologi untuk <i>Salmonella</i> .....	37



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) Susu bubuk ini merupakan revisi dari SNI. 01-2970-1999, *Susu bubuk*. Perumusan standar ini telah disusun oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman.

Tujuan penyusunan standar ini sebagai acuan sehingga susu bubuk yang beredar di pasar dapat terjamin mutu dan kemanannya.

Dalam merumuskan SNI ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan
2. Undang-undang RI No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen
3. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan
4. Keputusan Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan No.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam dalam Makanan
5. Keputusan Direktorat Jendral Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan

Standar ini telah dibahas melalui rapat-rapat teknis dan rapat pra konsensus pada tanggal 21 September 2005 dan terakhir dibahas dalam Rapat Konsensus Nasional pada tanggal 24 November 2005 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari Produsen, Asosiasi. Laboratorium Penguji, Eksportir dan Instansi Terkait.





## Susu bubuk

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji susu bubuk.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **susu bubuk**

produk susu yang diperoleh dengan cara mengurangi sebagian besar air melalui proses pengeringan susu segar dan atau susu rekombinasi yang telah dipasteurisasi, dengan atau tanpa penambahan vitamin, mineral, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan. Susu bubuk meliputi susu bubuk berlemak, rendah lemak dan tanpa lemak

#### 2.2

##### **susu bubuk berlemak**

susu bubuk yang tidak diambil lemaknya

#### 2.3

##### **susu bubuk kurang lemak**

susu bubuk yang telah dikurangi sebagian lemaknya

#### 2.4

##### **susu bubuk bebas lemak**

susu bubuk yang telah diambil lemaknya

#### 2.5

##### **susu rekombinasi**

produk susu yang diperoleh dengan cara melarutkan kembali susu bubuk dengan air, dan atau dicampur susu segar, dengan atau tanpa penambahan vitamin, mineral, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

### 3 Komposisi

#### 3.1 Bahan baku utama

susu segar dan atau susu rekombinasi

#### 3.2 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk produk susu yang sesuai dengan peraturan berlaku



#### 4 Syarat mutu

Syarat mutu susu bubuk sesuai Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1 Syarat mutu susu bubuk**

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan		
			Susu bubuk berlemak	Susu bubuk Kurang lemak	Susu bubuk bebas lemak
1	Keadaan				
	Bau	-	normal	normal	normal
	Rasa	-	normal	normal	normal
2	Kadar air	% b/b	Maks. 5	maks. 5	maks. 5
3	Lemak	% b/b	Min. 26	Lebih dari 1,5 – kurang dari 26,0	maks. 1,5
4	Protein (N x 6,38)	% b/b	Min. 23	min. 23	min. 30
5	Cemaran logam **				
	Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks. 20,0	maks. 20,0	maks. 20,0
	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 0,3	maks. 0,3	maks. 0,3
	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0/250,0*	maks. 40,0/250,0*	maks. 40,0/250,0*
	Raksa (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03
6	Cemaran arsen (As)**	mg/kg	Maks. 0,1	maks. 0,1	maks. 0,1
7	Cemaran mikroba				
	Angka lempeng total	Koloni/g	Maks. $5 \times 10^4$	maks. $5 \times 10^4$	maks. $5 \times 10^4$
	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	Maks. 10	maks. 10	maks. 10
	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	<3	<3	<3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	Maks. $1 \times 10^2$	maks. $1 \times 10^2$	maks. $1 \times 10^2$
	<i>Salmonella</i>	koloni/100g	Negatif	Negatif	Negatif
* untuk kemasan kaleng ** dihitung terhadap makanan yang siap dikonsumsi					

#### 5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh seperti tercantum pada lampiran A.



## 6 Cara uji

Cara uji untuk semua parameter syarat mutu susu bubuk seperti di bawah ini:

- a) Cara uji keadaan seperti pada Lampiran B.2
  - Cara uji bau seperti pada Lampiran B.2.1
  - Cara uji rasa seperti pada Lampiran B.2.2
- b) Cara uji kadar air seperti pada Lampiran B.3
- c) Cara uji kadar lemak seperti pada Lampiran B.4
- d) Cara uji protein seperti pada Lampiran B.5
- e) Cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran B.6
  - Cara uji tembaga (Cu) dan timbal (Pb) seperti pada Lampiran B.6.1
  - Cara uji timah (Sn) seperti pada Lampiran B.6.2
  - Cara uji raksa (Hg) seperti pada Lampiran B.6.3
- f) Cara uji arsen (As) seperti pada Lampiran B.7
- g) Cara uji cemaran mikroba seperti pada Lampiran B.8
  - Cara uji angka lempeng total seperti pada Lampiran B.8.2
  - Cara uji bakteri *coliform* dan *Escherichia coli* seperti pada Lampiran B.8.3
  - Cara uji *Staphylococcus aureus* seperti pada Lampiran B.8.4
  - Cara uji *Salmonella* seperti pada Lampiran B.8.5

## 7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai butir 5.

## 8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada peraturan yang berlaku, tentang pedoman cara produksi pangan yang baik.

## 9 Pengemasan

Susu bubuk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



## Lampiran A (normatif)

### Metode pengambilan contoh susu bubuk

#### A.1 Prinsip

Pengambilan contoh susu bubuk yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL 6,5 dan contoh diambil secara acak.

#### A.2 Penerapan pengambilan contoh

##### A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) Ukuran lot (N);
- c) Ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam kg);
- d) Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

##### A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:  
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).  
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih menyakinkan.
- b) Tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil susu bubuk
- c) Tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1.
- d) Ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot
- e) Uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar.
- f) Gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A.
- g) Nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c).

##### A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

###### A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton yang berisi kemasan berukuran 12 x 400 g setiap kartonnya. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- a. Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit



- b. Ukuran kemasan : 400 g
- c. Tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.3)
- d. Ukuran contoh (n) : 13
- e. Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

#### A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a. Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b. Ukuran kemasan : 400 g
- c. Tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.3)
- d. Ukuran contoh (n) : 21
- e. Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

#### A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, yang diterima berturut-turut sebanyak 4 dan 6.

### A.3 Rancangan pengambilan contoh

#### A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

**Tabel A.1 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13



**Tabel A.2 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

**Tabel A.3 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

#### A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)

**Tabel A.4 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19



**Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

**Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19



## Lampiran B (normatif)

### Cara uji parameter syarat mutu susu bubuk

#### B.1 Persiapan contoh

Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh diupayakan dari kemasan yang sama.

##### B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan susu bubuk dan ambil contoh susu bubuk sesuai yang diperlukan minimum 400 g secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh.

##### B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia

Buka kemasan susu bubuk dan ambil contoh susu bubuk sesuai yang diperlukan minimum 400 g secara hati-hati dengan menggunakan sendok yang bersih dan kering kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

#### B.2 Keadaan

##### B.2.1 Bau

###### B.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

###### B.2.1.2 Cara kerja

###### B.2.1.2.1 Serbuk susu bubuk

- ambil contoh uji kira-kira 5 g dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- cium contoh uji pada jarak kira-kira  $\frac{1}{2}$  cm dari hidung untuk mengetahui baunya;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

###### B.2.1.2.2 Larutan susu bubuk

- buat larutan susu bubuk sesuai syarat saji yang tertera pada kemasan di dalam gelas yang bersih dan kering;
- cium contoh uji pada jarak kira-kira  $\frac{1}{2}$  cm dari hidung untuk mengetahui baunya;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.



**B.2.1.2.3 Cara menyatakan hasil**

- a) jika tercium bau khas susu bubuk maka hasil dinyatakan "normal";
- b) jika tercium bau asing selain bau khas susu bubuk maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**B.2.2 Rasa****B.2.2.1 Prinsip**

melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera perasa (lidah).

**B.2.2.2 Cara kerja****B.2.2.2.1 Serbuk susu bubuk**

- a) ambil kira-kira 1 sendok contoh uji dan rasakan dengan lidah;
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

**B.2.2.2.2 Larutan susu bubuk**

- a) buat larutan susu bubuk sesuai syarat saji yang tertera pada kemasan di dalam gelas yang bersih dan kering;
- b) ambil kira-kira 1 sendok larutan susu bubuk dan rasakan dengan lidah;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

**B.2.2.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika terasa khas susu bubuk maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika terasa rasa asing selain rasa khas susu bubuk maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**B.3 Kadar air****B.3.1 Prinsip**

Bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu  $(102 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Bobot yang hilang atau kadar air dihitung secara gravimetri.

**B.3.2 Peralatan**

- a) desikator yang berisi desikan;
- b) botol timbang dengan penutup;
- c) oven terkalibrasi dengan ketelitian  $1^{\circ}\text{C}$ ;
- d) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

**B.3.3 Cara kerja**

- a) panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada suhu  $(102 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (botol timbang dan tutupnya) ( $W_0$ );
- b) masukkan 1g sampai 3 g contoh ke dalam botol timbang, tutup, dan timbang ( $W_1$ );
- c) panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup botol disamping botol di dalam oven pada suhu  $(102 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  selama dua jam (dua jam setelah suhu oven  $102^{\circ}\text{C}$ );



- d) tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, pindahkan segera kedalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang ( $W_2$ );
- e) lakukan pekerjaan duplo;
- f) hitung kadar air dalam contoh.

#### B.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

$W_0$  adalah bobot botol timbang kosong dan tutupnya, (g);

$W_1$  adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

$W_2$  adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, (g).

#### B.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

### B.4 Lemak

#### B.4.1 Prinsip

Lemak dalam contoh dihidrolisis dengan amonia dan alkohol kemudian diekstraksi dengan eter. Ekstrak eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dalam pinggan alumunium dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

#### B.4.2 Pereaksi

- a) air suling;
- b) amonium hidroksida pekat;
- c) indikator fenolftalein 0,5 %;
- d) etil alkohol 95 %;
- e) etil eter, bebas peroksida;
- f) petroleum eter;

#### B.4.3 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) pipet volumetrik 25 ml;
- c) penangas air;
- d) labu ekstraksi/ labu Majonnier;
- e) sentrifus;
- f) oven terkalibrasi dengan ketelitian 1°C;
- g) desikator yang berisi desikan;
- h) pinggan aluminium atau Labu lemak (Mojonnier);
- i) gelas ukur.

#### B.4.4 Cara kerja



- a) timbang 1 g contoh susu bubuk ke dalam labu ekstraksi (W), tambahkan 10 ml air suling, aduk sehingga membentuk pasta, dan panaskan jika diperlukan;
- b) tambahkan 1ml sampai 25 ml ammonium hidroksida pekat, panaskan dalam penangas air pada suhu 60°C sampai 70°C selama 15 menit, sesekali diaduk dan dinginkan;
- c) tambahkan 3 tetes indikator fenolftalein, 10 ml alkohol 95 %, tutup labu ekstraksi, dan aduk selama 15 detik;
- d) untuk ekstraksi pertama; tambahkan 25 ml etil eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit
- e) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan.
- f) tambahkan 25 ml petroleum eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit
- g) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan.
- h) sentrifuse labu tersebut pada 600 rpm selama 30 detik sehingga terjadi pemisahan fasa air (*bright pink*) dan eter dengan jelas.
- i) tuangkan lapisan eter dengan hati-hati kedalam labu lemak atau pinggan alumunium kosong yang telah diketahui bobotnya ( $W_0$ );
- j) lapisan air digunakan untuk ekstraksi berikutnya.
- k) untuk ekstraksi kedua, ulangi cara kerja c – j dengan penambahan 5 ml alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter .
- l) untuk ekstraksi ketiga, ulangi cara kerja c – j dengan tanpa penambahan alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter (ekstraksi ke-3 tidak perlu dilakukan untuk susu skim)
- m) uapkan pelarut diatas penangas air dan keringkan labu lemak/pinggian alumunium yang berisi ekstrak lemak tersebut dalam oven pada suhu  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$  selama 30 menit atau oven vakum pada suhu 70°C sampai 75°C dengan tekanan  $<50 \text{ mm Hg}$  (6,7 Kpa);
- n) dinginkan dalam desikator dan timbang hingga bobot tetap ( $W_1$ ).

#### B.4.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100\%$$

dengan;

W adalah bobot contoh, (g);

$W_0$  adalah bobot labu lemak/pinggian alumunium kosong, (g);

$W_1$  adalah bobot labu lemak/pinggian alumunium kosong dan lemak, (g).

#### B.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil lemak atau deviasi (*RSD*) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau *RSD* lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

### B.5 Protein (N×6,38)

#### B.5.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  menggunakan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sebagai katalis dan  $\text{K}_2\text{SO}_4$  untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi  $\text{NH}_3$  pada saat destilasi menggunakan  $\text{NaOH}$ .  $\text{NH}_3$  yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,38.



**B.5.2 Perekasi**

- a) asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat bebas nitrogen;
- b) larutan katalis tembaga,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  bebas nitrogen 0,05 g/ml  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- c) larutkan 5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- d) katalis selen;
- e) campurkan 4 g serbuk  $\text{SeO}_2$ , 150 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- f) kalium sulfat,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  bebas nitrogen;
- g) batu didih;
- h) larutan indikator *methyl red* (MR) / *bromocresol green* (BCG);
- i) larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- j) larutan asam borat,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;
- k) larutkan 40 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- l) larutan natrium hidroksida,  $\text{NaOH}$  30 %;
- m) larutkan 600 g hablur  $\text{NaOH}$  dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- n) larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %;
- o) larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.
- p) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  0,1000M.
- q) pipet dengan hati-hati 8,60 ml  $\text{HCl}$  pekat (36,5–38 %) kedalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.

**B.5.3 Peralatan**

- a) labu Kjeldahl 100 ml;
- b) distilator dan kelengkapannya;
- c) pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- d) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) buret 10 ml terkalibrasi;
- f) batu didih.

**B.5.4 Cara kerja**

- a) timbang 1 g contoh ke dalam labu Kjeldahl, tambahkan 15,00 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1 ml larutan katalis  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  atau 1 g campuran katalis selen, 8-10 batu didih dan 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 75 ml larutan  $\text{NaOH}$  30 %. (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) sulingkan selama 5 - 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan  $\text{HCl}$  0,1000 M;
- h) kerjakan penetapan blanko.



### B.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 100\%}{W}$$

dengan:

- $V_1$  adalah Volume HCl 0,1000 N untuk titrasi contoh, (ml);
- $V_2$  adalah Volume HCl 0,1000 N untuk titrasi blanko, (ml);
- N adalah Normalitas larutan HCl;
- W adalah bobot contoh (mg);
- 14,008 adalah bobot atom Nitrogen.
- 6,38 adalah faktor protein untuk susu.

### B.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

## B.6 Cemarkan logam

### B.6.1 Penetapan cemarkan logam Cu dan Pb

#### B.6.1.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada 500°C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

#### B.6.1.2 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml – 100 ml;
- c) penangas listrik;
- d) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- e) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu dan Pb) terkalibrasi;
- f) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml,
- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- h) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- i) gelas piala 250 ml;
- j) penangas air.

#### B.6.1.3 Pereaksi

- a) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- c) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;
- d) encerkan 7 ml  $\text{HNO}_3$  65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan asam klorida, HCl 6 N;
- f) encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- g) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 % dalam alkohol;  
larutkan 10 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.



- h) larutan baku 1000 µg/ml Cu;  
larutkan 1,000 g Cu dengan 7 ml HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000 µg/ml siap pakai.
- i) larutan baku 200 µg/ml Cu;  
pipet 10 ml larutan baku 1000 µg/ml Cu ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/ml Cu.
- j) larutan baku 20 µg/ml Cu;  
pipet 10 ml larutan baku 200 µg/ml Cu ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/ml Cu.
- k) larutan baku kerja Cu;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 ml; 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,4 µg/ml dan 1,8 µg/ml Cu.
- l) larutan baku 1000 µg/ml Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 µg/ml siap pakai.
- m) larutan baku 50 µg/ml Pb;  
pipet 5,0 ml larutan baku 1000 µg/ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/ml.
- n) larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml dan 2,0 µg/ml Pb.

#### B.6.1.4 Cara kerja

- a) timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji terbakar dan tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml MgNO<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur 500°C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO<sub>3</sub> pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500°C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N atau 5 ml HNO<sub>3</sub> 1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
- g) jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring Whatman No.41 ke dalam labu ukur 50 ml;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;



- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 324 nm untuk Cu dan 283 nm untuk Pb);
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) hitung kandungan logam dalam contoh.

#### B.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ( $\mu\text{g/ml}$ );

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m Adalah bobot contoh, (g).

#### B.6.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11% maka analisis harus diulang.

### B.6.2 Penetapan timah (Sn)

#### B.6.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian ditambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

#### B.6.2.2 Pereaksi

- a) larutan kalium, 10 mg/ml K;  
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- b) asam nitrat pekat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- c) asam klorida pekat,  $\text{HCl}$  pekat;
- d) larutan baku 1000 mg/l Sn;  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 ml  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 15  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$  dan 25  $\mu\text{g/ml}$  Sn.

#### B.6.2.3 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) erlenmeyer 250 ml;
- c) penangas listrik;
- d) tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- e) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- f) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi;



- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- h) gelas ukur kapasitas 50 ml;
- i) gelas piala 250 ml;
- j) penangas air.

#### B.6.2.4 Cara kerja

- a) timbang 5g sampai 10 g contoh ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml  $\text{HNO}_3$  pekat, dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sampai sisa volume 3ml sampai 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang.
- d) angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml  $\text{HCl}$  pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap  $\text{Cl}_2$  berhenti.
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai 15 ml.
- f) tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling;
- g) tambahkan 1,0 ml  $\text{KCl}$ , dinginkan pada temperatur ruang, tara dengan air suling, dan saring.
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ ;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) hitung kandungan logam dalam contoh.

#### B.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ( $\mu\text{g/ml}$ )

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

#### B.6.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11%, maka analisis harus diulang kembali.

### B.6.3 Penetapan raksa (Hg)

#### B.6.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.



**B.6.3.2 Preaksi**

- a) asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N;
- b) asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 N;
- c) batu didih;
- d) campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- e) hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- f) larutan molibdat 2 %.
- g) larutan pereduksi;
- h) campuran 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan  $\text{NaBH}_4$ ;
- j) larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- k) larutan pengencer;
- l) masukkan 300 ml sampai 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml  $\text{HNO}_3$  kemudian 67 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- m) larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Hg;
- n) larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- o) larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  Hg;
- p) pipet 1 ml larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$ .
- q) larutan baku kerja Hg;  
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,005  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; dan 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Hg.

**B.6.3.3 Peralatan**

- a) spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- d) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- e) labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- f) penangas listrik;
- g) gelas ukur 25 ml;
- h) pipet ukur berskala 0,05 atau mikroburet terkalibrasi

**B.6.3.4 Cara kerja****B.6.3.4.1 Pengabuan basah**

- a) timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N, 20 ml  $\text{HNO}_3$  7 N, 1 ml larutan Natrium molibdat 2 %, dan 5 batu didih sampai 6 batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;



- c) tambahkan 20 ml  $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- j) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- k) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- l) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- m) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- n) hitung kandungan Hg dalam contoh;

#### B.6.3.4.2 Destruksi menggunakan digester microwave dengan sistim tertutup

- a) timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- i) hitung kandungan Hg dalam contoh;

#### B.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Hg (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ( $\mu\text{g/ml}$ )
- V adalah volume larutan akhir, (ml);
- m adalah bobot contoh, (g).

#### B.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi(RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.



## B.7 Cemaran arsen (As)

### B.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

### B.7.2 Peralatan

- spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- labu Kjeldahl 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml.
- gelas ukur 25 ml
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikroburet terkalibrasi

### B.7.3 Pereaksi

- asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat
- natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  ;
- larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;
- larutkan 66 ml  $\text{HCl}$  37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;
- timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml  $\text{HCl}$  37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %;
- timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  As;
- larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku 100  $\mu\text{g/ml}$  As;
- pipet 10 ml larutan baku arsen 1000  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  As.
- larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As;
- pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  As.
- larutan baku kerja As;
- pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis



kemudian kocok Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml dan 0,05 µg/ml As.

#### B.7.4 Persiapan contoh

##### B.7.4.1 Pengabuan basah

- timbang 5 g contoh dalam labu Kjeldahl dan tambahkan 20 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan 15 ml HNO<sub>3</sub> pekat;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO<sub>3</sub> pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- tambahkan 10 ml HClO<sub>4</sub> sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO<sub>3</sub> pekat);
- pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;

##### B.7.4.2 Pengabuan kering

- timbang 5 g contoh dalam cawan dan tambahkan 2,5 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O dan 25 ml HNO<sub>3</sub> pekat;
- aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan;
- abukan dalam tanur 500°C selama 2 jam, dinginkan dan basahkan dengan HNO<sub>3</sub> pekat. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada 500°C sampai didapat abu berwarna putih;
- larutkan dengan larutan HCl 1:3 dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;

##### B.7.4.3 Destruksi dengan *microwave* (sistem tertutup)

- timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml HNO<sub>3</sub>, 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat.
- masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;

#### B.7.5 Cara kerja

- siapkan NaBH<sub>4</sub> dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- pipet 25 ml larutan destruksi dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- hitung kandungan As dalam contoh.



### B.7.6 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

### B.7.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi(RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

## B.8 Cemarkan mikroba

### B.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri coliform, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*

#### B.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### B.8.1.2 Larutan Pengencer

- |                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| a) <i>Buffered Pepton Water</i> (BPW) |         |
| b) Pepton                             | 10 g    |
| c) Natrium klorida                    | 5 g     |
| d) <i>Disodium hydrogen phosphate</i> | 3,5 g   |
| e) <i>Kalium dihydrogen phosphate</i> | 1,5 g   |
| f) Air suling                         | 1000 ml |
- g) Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet 225 ml atau 450 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

#### B.8.1.3 Peralatan

- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- gelas piala steril;
- labu erlenmeyer steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril;
- tabung reaksi;
- alat pembuka kemasan steril;
- pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- penangas listrik.



**B.8.1.4 Cara kerja**

- timbang 25 g contoh dan masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10.
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

**B.8.2 Angka lempeng total (metode *plate count*)****B.8.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 24 jam sampai 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

**B.8.2.2 Peralatan**

- cawan petri gelas / plastik diameter 90 mm – 100 mm steril;
- pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml;
- penangas air;
- lemari pengering (inkubator);
- alat penghitung koloni (*colony counter*);
- autoclave*;
- oven/Alat sterilisasi kering.

**B.8.2.3 Pembenihan dan pengencer****a. *Plate count agar* (PCA)**

- <i>Pancreatic digest of Caseine</i>	5 g
- <i>Yeast extract</i>	2,5 g
- Glukosa	1 g
- Agar	15 g
- Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol 1000 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit

**b. *Buffered peptone water* (BPW)**

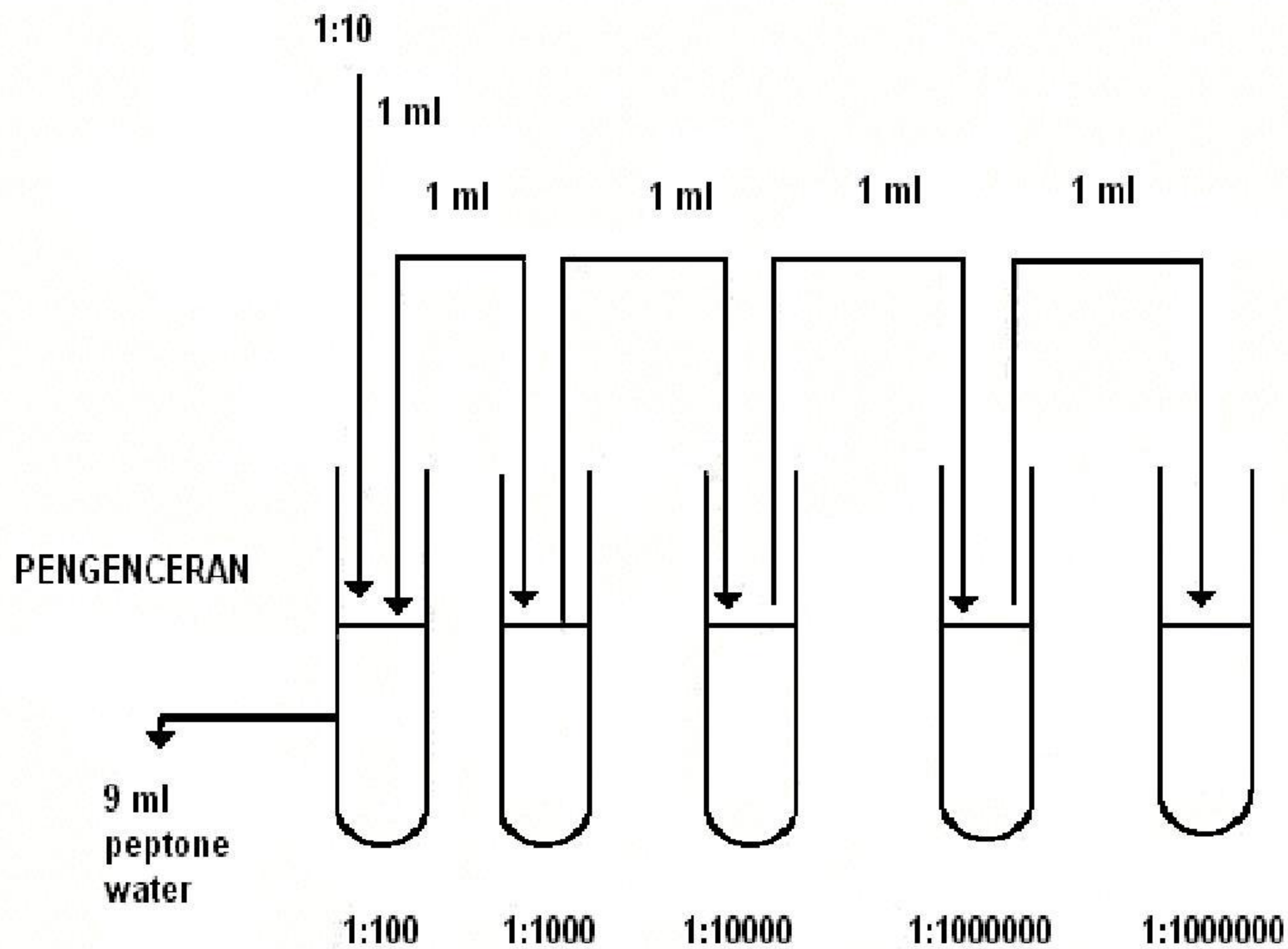
- <i>Peptone</i>	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Disodium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet 225 ml atau 450 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.

**B.8.2.4 Cara kerja**

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar 1 dengan menggunakan larutan pengencer *Buffered peptone water*;





**Gambar B. 1 Metoda pengenceran**

- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^1$  sampai  $10^4$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- Tuangkan 12 ml sampai 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  ke dalam masing-masing cawan petri.;
- Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- Biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  selama 24 jam sampai 48 jam;
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai 250 koloni setelah 48 jam;

#### B.8.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total ( koloni/g) =  $n \times F$

Dengan:

n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

#### B.8.2.6 Pernyataan hasil

##### B.8.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri



menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.

- b) Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

$n_1$  adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

$n_2$  adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) Jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.

- Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~ 640		$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~ 7150 65		$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$	~
6490 59		$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$	

- e) Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah .



- f) Menghitung koloni perambat.  
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- Merupakan rantai yang tidak terpisah;
  - Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan;
  - Perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### B.8.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas.  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- b) Jika angka ketiga kurang dari 5 maka bulatkan kebawah.  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- c) Jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
  - Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### B.8.3 Bakteri *coliform* dan *Escherichia coli*

#### B.8.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

#### B.8.3.2 Peralatan

- a) cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- b) pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- c) botol pengenceran ( $\pm 20$  ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- d) lemari pengering (Inkubator),  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- e) tabung reaksi dan tabung Durham;
- f) rak untuk tabung reaksi;
- g) jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- h) penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi,  $(45,5 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ .

#### B.8.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *Lauryl tryptose (LST) broth*;
- b) *brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2 %;
- c) *E. C. Broth*;
- d) *levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- e) *plate Count Agar (PCA)*;
- f) gram stain;
- g) *tryptone (tryptophane) broth*;
- h) pereaksi Kovacs'.



- i) MR - VP broth;
- j) pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) larutan *Methyl Red*;
- l) *koser's Citrate Medium*;
- m) *bacto Peptone Water* 9 ml dalam tabung-tabung steril;
- n) pereaksi *Indole*;
- o) larutan Kalium Hidroksida 40 %;
- p)  $\alpha$ -naftol/;
- q) preatin.

#### B.8.3.4 Cara kerja

##### B.8.3.4.1 *Presumptive test* untuk Bakteri *coliform* (Uji Dugaan)

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.8.1.4.
- b) Inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Laurryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) Masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) Amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- $(24 \pm 2)$  jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif;
- g) Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

##### B.8.3.4.2 *Confirmed Test* untuk Bakteri *coliform* (Uji Penegasan)

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel 3., tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ;
- e) Laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.

##### B.8.3.4.3 *Confirmed Test* untuk uji *Escherichia coli*

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan;
- c) Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ . Penangas air dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.;
- d) Periksa tabung EC tersebut pada jam ke- $(48 \pm 2)$  jika telah terbentuk gas dalam jumlah berapapun maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati;



- f) Digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm
- g) Inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai 24 jam pada  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ;
- h) Periksa pinggan - pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam;
- i) Dari tiap pinggan L - EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia;
- j) Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 jam sampai 24 jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ . Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, E coli adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora;
- k) Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC.

- **Pembentukan indol**

- Inokulasi tabung tryptone broth.
- Inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml pereaksi Kovacs'.
- Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.

- **Reaksi Voges Proskauer dan Methyl red**

- Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
- Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.
- Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
- Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung.
- Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.

- **Penggunaan Sitrat**

- Dengan hati - hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
- Inkubasikan selama 96 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).

- **Pembentukan gas dari Lactose**

- Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

#### B.8.3.5 Klasifikasi dan laporan

**Tabel B.1 Reaksi biokimia E. coli pada uji IMVIC**

Jasad	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrate
Escherichia Coli				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-



- Klasifikasikan sebagai E. coli apabila uji IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak bersepora atau coccus yang membentuk Gas dalam kaldu LST dengan waktu inkubasi ( $48 \pm 2$ ) jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Hitunglah APM E. coli dengan menggunakan tabel APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung E coli.

**Tabel B.2 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh**

Tabung yang positif			APM/MPN	Tabung yang positif			APM/MPN
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

#### B.8.4 *Staphylococcus aureus* (Metode plate count)

##### B.4.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 45 jam sampai 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

##### B.8.4.2 Peralatan

- spreader steril;
- botol pengencer 500 ml;
- tabung reaksi;
- gelas ukur 10 ml;
- cawan petri;
- gelas sediaan;
- inkubator  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- pipet ukur;
- jarum ose/inokulasi.



**B.8.4.3 Perbenihan dan pereaksi**

- a) *baird-parker* agar
- b) *brain heart infusion broth* (BHIB)
- c) plasma kelinci

**B.8.4.4 Cara kerja**

- a) lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.8.1.4.
- b) pipet masing-masing 0,2 ml; 0,3 ml dan 0,4 ml larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing 3 cawan petri yang berisi media BPA.
- c) sebarkan contoh secara merata dengan menggunakan *spreader steril*. Tahan cawan pada posisi tegak lurus sampai contoh tidak mudah terserap oleh medium (+10 menit). Apabila contoh tidak mudah diserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik.
- d) inkubasikan pada suhu 35°C selama 45 jam sampai 48 jam.
- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus* dengan ciri yaitu koloni berbentuk bulat licin, basah berdiameter 2,2 mm sampai 3 mm berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum inokulasi.

**B.8.4.5 Uji koagulase**

- a) pindahkan koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 ml sampai 0,3 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB).
- b) inkubasikan pada suhu 35°C selama 18 jam sampai 24 jam.
- c) tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam kultur BHIB dan campur.
- d) inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  selama 18 jam sampai 24 jam dan memeriksanya setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *Staphylococcus aureus*.
- e) ratakan koloni dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencernya.

**B.8.4.6 Perhitungan**

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) =  $n \times F \times 10$

dengan:

n adalah jumlah koloni, (koloni/g)

F adalah faktor pengenceran

**B.8.5 Salmonella****B.8.5.1 Prinsip**

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga salmonella pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri salmonella.



#### B.8.5.2 Peralatan

- a) neraca analitik;
- b) kertas pH;
- c) pipet 10 ml;
- d) pipet tetes;
- e) botol pengencer 1000 ml;
- f) tabung reaksi;
- g) gelas ukur 10 ml, dan 100 ml;
- h) cawan petri 90 mm – 100 mm dan 140 mm – 150 mm;
- i) gelas sediaan;
- j) inkubator 35°C;
- k) oven;
- l) penangas air;
- m) pengaduk gelas;
- n) sengkelit (ose) / jarum inokulasi;
- o) pensil lilin
- p) bunsen;
- q) otoklaf.

#### B.8.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *selenite cystine broth*;
- b) *tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant green*);
- c) *xylose lysine desoxycholate broth* (XLD);
- d) *hektoen enteric agar* (HE);
- e) *bismuth sulfite agar* (BSA);
- f) *triple sugar iron agar* (TSI);
- g) *buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) *urea agar*;
- i) *brilliant green dye solution* 1 %;
- j) air destilata steril;
- k) pereaksi indol dan pembenihan indol;
- l) *lysine decarboxylation medium* (LDC);
- m) nutrien agar;
- n) *reagen kovacs*;
- o) *polyvalent somatic (o) test*;
- p) *polyvalent flagellar (h) test*;
- q) HCl;
- r) NaOH;
- s) larutan physiological saline 0,85%;
- t) larutan potasium hydroxide 40%;
- u) larutan formalized physiological saline;
- v) rapid urea broth;
- w) mac conkey agar;
- x) simmon citrate agar;
- y) triptone broth.

#### B.8.5.4 Cara kerja

##### B.8.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 100 g contoh ke dalam botol pengencer 1000 ml dan tambahkan 900 ml air destilata steril kocok hingga campur merata;



- b) Biarkan pada suhu ruang selama 60 menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai  $6,8 \pm 0,2$ ;
- c) Tambahkan 0,45 ml larutan *Briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata;
- d) Kendurkan tutup wadah secukupnya  $1/4$  putaran, inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .

#### B.8.5.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 100 ml *selenite cystine broth* atau pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 100 ml *tetrathionate broth*;
- c) Inkubasikan pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam.

#### B.8.5.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE, dan BS agar. Siapkan BS agar satu hari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- b) Ulangi cara di atas dari media pengkayaan SCB;
- c) Inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- d) Amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*;  
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :  
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dan masing-masing media agar selektif setelah  $(24 \pm 2)$  jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut :  
XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur salmonella memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.  
HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.  
BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media sekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama  $(24 \pm 2)$  jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA selama inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- f) Dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu  $5^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ ;
- g) Inkubasi TSI dan LIA pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya  $\text{H}_2\text{S}$  yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan dengan atau tanpa  $\text{H}_2\text{S}$  (warna kehitaman agar). Pada LIA kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif.



Umumnya kultur *Salmonella* membentuk H<sub>2</sub>S pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;

- h) Semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti mulai no. F di atas;
- i) Lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap :
  - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, SCB ;
  - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

#### B.8.5.5 Identifikasi *Salmonella*

##### B.8.5.5.1 Kultur campuran

Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *Mac Conkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* :

- a) *Mac Conkey agar*.  
Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- b) *Hektoen Enteric (HE)*.  
Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- c) *Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar*.  
Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti butir B.8.5.4.3.f dan lanjutkan seperti pada butir B.8.5.4.3.g.

##### B.8.5.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease konvensional  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *urea agar*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C.
- b) Uji urease cepat  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea broth*. Inokulasikan 2 jam dalam *water bath* pada suhu (37 ± 0,5)°C. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif ( tidak terjadi perubahan warna)



**B.8.5.5.3 Pengujian kultur urease negatif****a) *Lysine Decarboxylase Broth (LDB)***

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam.

**b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;**

Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

**c) *Tryptone (tryptophane) broth (TB)*;**

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

**1 *Potassium Cyanida (KCN) broth***

Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN broth. Tutup tabung rapat-rapat dan lapi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan. Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai terjadinya kekeruhan.

**2 *Malonate broth***

Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang *Malonate broth* tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

**3 Uji indol** Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml *reagent kovacs*. Amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai +. Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* bila reaksi indol positif dan flagellar (H) negatif atau KCN positif dan LDB negatif;

**B.8.5.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)****a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan *reaksi urease* negatif ke dalam:**

1) *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai 6 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau 2) *Trypticase Soy Trypticase broth (TSTB)* dan inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  (untuk uji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas.

**b) Siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar (H) antisera*. Masukkan  $\pm 0,5$  ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar (H) antisera* dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized antigen*. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu  $48^{\circ}\text{C}$  sampai  $50^{\circ}\text{C}$ . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.**

Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol



Negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

#### B.8.5.5.5 Uji serologi dengan *Polyvalent Somatic (o)*

- Dengan menggunakan pensil lilin, Buat garis 4 persegi panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau kaca gelas sediaan ;
- Emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai 48 jam dengan 2 ml 0,85 % saline menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *Tryptose Blood agar base* tanpa darah);
- Tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- Tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent Somatic (o)* anti serum kedalam bagian yang lain;
- Campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit;
- Klasifikasi uji *polyvalent somatic (o)* menunjukkan hasil sebagai berikut:
  - **Positif** : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan.
  - **Negatif** : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan.
  - **Tidak spesifik** : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline.

#### B.8.5.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada tabel 4 butir 1 – 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi Flagellar (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada butir B.8.5.5.1 di atas dan uji kembali pada butir B.8.5.5.2.

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti tabel 2 :

- Phenol red lactose atau purple lactose broth*  
Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam.  
Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.  
Dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*;
- Phenol red sucrose atau purple sucrose broth*  
Ikuti prosedur seperti pada B.8.5.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- Methyl Red - Voges Proskauer (MR – VP)*  
Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .  
Lakukan uji Voges-Proskauer (MR-VP) pada suhu ruang sebagai berikut :



Pindahkan 1 ml MR-VP broth yang telah diinkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP broth selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Tambahkan 0,6 ml alpha naftol dan aduk. Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif.

*Uji merah metil (MR)*

Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif;

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) *Simmons citrate agar*

Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama  $(96 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .

Positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dan hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil citrat positif.

Negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

#### B.8.5.5.7 Pelaporan

Laporkan sebagai *Salmonella* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada tabel 4. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada tabel 5. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari butir B.9.5.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.



Tabel B.4 Reaksi biokimia dan serologi *salmonella*

No.	Uji substrat	Hasil Reaksi Positif	Hasil Reaksi Negatif	Salmonella Reaksi Species <sup>a</sup>
1	<i>Glucose</i>	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2	<i>Lysine decarboxylase (LIA)</i>	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3	<i>H<sub>2</sub>S (TSI dan LIA)</i>	Hitam	Tidak hitam	+
4	<i>Urease</i>	Warna ungu sampai merah	-	-
5	<i>Lysine decarboxy Broth</i>	Warna ungu	Warna kuning	+
6	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	Warna kuning dengan gas	Tanpa/tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ <sup>b</sup>
7	<i>KCN broth</i>	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	Warna biru	Tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
9.	<i>Indol test</i>	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10.	<i>Polyvalent flagellar test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
11.	<i>Polyvalent somatic test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
13	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	<i>Voges-prokquer test</i>	Ungu sampai merah	Tidak berubah warna	-
15.	<i>Methil red test</i>	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons Citrate</i>	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	V
<b>Keterangan :</b> <sup>a</sup> adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari - adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari V adalah variabel <sup>b</sup> adalah mayoritas dari kultur Arizona : negatif <sup>c</sup> adalah mayoritas dari kultur Arizona : positif				



Tabel B.5 Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella*

No.	Test Substrat	Hasil
1.	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu merah)
2.	<i>Test indol dan test polivalen flagellar (H)</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3.	<i>Lysine decarboxylase dan KCN broth</i>	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)
4.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) <sup>a b</sup>
5.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) <sup>b</sup>
6.	<i>Voges- Prokquer test methyl red test</i>	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)
<b>Keterangan :</b> <sup>a</sup> <i>Test malonate broth</i> positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut <i>Salmonella arizonae</i> <sup>b</sup> Jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i>		





## Bibliografi

- CODEX Alimentarius Commision. 1996. *CODEX Standar For Milk Powders and Cream Powder*. CODEX STAN 207-99.
- CODEX Alimentarius Commision. 1996. *FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Foods (AQL-6.5)*. CAC/RM 42-1969
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 970.28, Sampling of Dried Milk and Its Product*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 33.1.04.
- International Dairy Federation. *Milk and Cream Powder – Determination of Water Content*. IDF – FIL, 26A (1993).
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 932.06, Fat in Dried Milk*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 33.5.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 930.29, Protein in Dried Milk*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 33.5.03.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Food, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods*, 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 967.25, Salmonella in Foods, Preparation of culture media and reagents*. 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.9.01.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 1998. *Aerobic Plate Count*. 8<sup>th</sup> edition. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 1998. *Escherichia coli and Coliform Bacteria*. 8<sup>th</sup> edition. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 1998. *Staphylococcus aureus*. 8<sup>th</sup> edition. Chapter 12.









**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)